Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor Prof. Dr. Kurt Felix)

Über den Abbau des l(–)-Leucin.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Kurt Matthäus
aus Butzbach (Hessen)

1941

Druck von Michael Laßleben, Kallmünz über Regensburg.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt a. M.

Referent: Prof. Dr. Felix
Korreferent: Prof. Dr. Dirschel
Dekan: Prof. Dr. Guthmann

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Vorliegende Arbeit wurde vom 1. August 1938 bis Ende März 1939 im Institut für vegetative Physiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M., auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. Kurt Felix ausgeführt.

Auch an dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Felix für die Überlassung dieser Arbeit, sowie für die vielseitigen Anregungen und seine liebenswürdige Unterstützung bei ihrer Ausführung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Über den Abbau des l(—)-Leucin.

Das Leucin gehört zu den für den Eiweißstoffwechsel unentbehrlichen Aminosäuren. Die natürliche linksdrehende Form findet sich im Organismus normalerweise in der Milz, im Pankreas, im Gehirn und in den drüsigen Organen wie Lymphdrüsen, Speicheldrüsen, Schilddrüse und Thymusdrüse. Bei pathologischen Vorgängen läßt sich das l(—)-Leucin auch im Blute nachweisen, vor allem bei akuter Leberatrophie.

In letzter Zeit haben Kögl und Erxleben (9) in malignen Tumoren neben der l(—)-Form auch die d(+)-Form isolieren können. Bei Kaninchennetztumoren betrug der Anteil der d-Form 3,9%, bei Mäusetumoren 4,2%, bei einem menschlichen Ovarialcarcinom 7,2% des isolierten Gesamtleucins.

Seit den grundlegenden Versuchen über den Aminosäurestoffwechsel im Tierkörper ist es bekannt, daß sich die beiden Isomere des Leucins beim Abbau verschieden verhalten. Embden (3) fand bei Leberdurchblutungsversuchen bei Zusatz von nichtnatürlichen d(+)-Leucin vermehrt Aceton, während das natürliche keine Ketonkörper bildete. Löffler (12) gibt an, daß nach Zugabe von l(—)-Leucin zum Durchströmungsblut vermehrt Harnstoff gebildet wurde. Im Magensaft von Hunden mit Pawlow-Fistel konnte Ikebe (7) nach Injektion von l(—)-Leucin in die Blutbahn Ketonkörper feststellen. Krebs (10, 11) fand bei seinen Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren mit Hilfe von Gewebsschnitten, daß in der Niere und in der Leber von Ratten das natürliche l(—)-Leucin oxydativ desaminiert wird. Allerdings sei die Desaminierungsgeschwindigkeit bei der natürlichen Form erheblich geringer als bei der nichtnatürlichen. Nach Krebs ist als Hauptort der Desaminierung der Aminosäuren die Niere anzusehen, an zweiter Stelle steht die Leber, die anderen Organe spielen eine untergeordnete Rolle.

Neuere Arbeiten haben jedoch gezeigt, daß auch andere Organe am Aminosäurenstoffwechsel Anteil haben, so wird z. B. die Glutaminsäure von Gehirnschnitten abgebaut und Braunstein und Kritzmann (1) beschrieben die Umaminierung von Glutaminsäure im Muskelgewebe.

Um die Größe der Desaminierung einer Aminosäure auszudrükken, bezieht Krebs die entstehende Menge NH_3 pro Zeiteinheit auf das Trockengewicht der Gewebsschnitte. Der so erhaltene Ammoniakquotient für die beiden Leucine wird wie folgt angegeben (Krebs 10):

	mg Gewebe	Gebildetes NH_3 (cmm)	QNH_3
l-Leucin	2,58	17,2	6,66
d-Leucin	1,99	49,5	24,9
Leerversuch	3,11	4,21	1,36

Die Aminosäurenkonzentration betrug m/20, die Flüssigkeitsmenge 2,5 ccm. Bei einem Verbrauch von einem Atom Sauerstoff pro Mol Leucin müßten 2,1 mg NH_3 = 2767 cmm NH_3 gebildet werden. Die Differenz von 13,71 cmm NH_3 (bezogen auf den Leerversuch) entsprechen 0,46% der Theorie für das l-Leucin und der Unterschied von 46,81 cmm NH_3 beim d-Leucin 1,6%.

Edson (2) bestimmte neben dem Sauerstoffverbrauch bei Rattenleberschnitten die entstehende ß-Ketosäure (Acetessigsäure), doch ist die Anzahl seiner Versuche zu gering, um einen eindeutigen Beweis für den Abbau zu erbringen.

Mit Hilfe von Rattennierenextrakt fanden Bernheim und Bernheim (4), daß sich die nichtnatürliche Form des Leucins besser oxydiere als die natürliche. Auch hier handelt es sich bei der Sauerstoffaufnahme der Versuche mit l(—)-Leucin um einen Wert, der in der Schwankungsbreite der Eigenatmung liegt. Felix und Zorn (6) konnten bei Versuchen mit Schweinenierenextrakt beim natürlichen Leucin einen Sauerstoffverbrauch von 5,2% der Theorie feststellen, während die nichtnatürliche Komponente 41,6% des theoretisch geforderten Sauerstoffes aufnahm und isolierten 31,3% der erwarteten α-Ketoisocapronsäure.

Um die Fehlerquellen, die der Krebs'schen Methode anhaften auszuschalten, hat sich Heinsen (7) einer Makroschnittmethode bedient, mit der er die Aminosäuren auf ihre Fähigkeit Ketonkörper zu bilden untersuchte. Bei solchen Schnitten von Meerschweinchenleber fand er bei Zugabe von l(—)-Leucin mehr Ketokörper als bei d(+)-Leucin.

Faßt man diese Untersuchungsergebnisse zusammen, so wurde bei einem Teil der Arbeiten beim Abbau des natürlichen l(—)-Leucin Ammoniak gefunden, beim anderen Aceton. Es könnte sehr wohl möglich sein, daß es sich um einen oxydativen Vorgang handelt, der an das Vorhandensein von mindestens zwei Fermentsysteme gebunden ist, an eine Desaminase und an ein Enzym das Aceton abspaltet. Einen Einblick in den Abbaumechanismus erhält man, wenn man den Sauerstoffverbrauch pro Mol Leucin berechnet. Felix und Zorn (5) haben am Tyrosin gezeigt, daß es möglich ist durch Änderung des pH den Abbau in verschiedene Phasen zu zerlegen.

Theoretisch wäre im Falle einer oxydativen Desaminierung pro Mol Leucin ein Mol NH_3 und ein Mol α-Ketoisocapronsäure zu erwarten. Beim d(+)-Leucin konnten Felix und Zorn (10) diesen

Abbau durch Isolierung der α-Ketoisocapronsäure nachweisen. Bei einer Oxydation ohne Desaminierung könnte Aceton entstehen und ein stickstoffhaltiger Restkörper.

Wir haben nun versucht den Abbauvorgang des l(—)-Leucins aufzuklären und stellten Untersuchungen an mit:

1. Organbreien von Schweineleber und Schweinenieren,
2. Gewebsschnitte von Rattenleber und Rattenniere,
3. Makroschnitte von Meerschweinchenleber.

Um die Größe der Atmung zu bestimmen verwendeten wir die Warburgapparatur mit manometrischer Sauerstoffmessung. Das entstehende Ammoniak wurde nach der Methode von Parnas, das Azeton nach Embden bestimmt.

Jedem eigentlichen Versuche ließen wir eine Reihe von Vorversuchen vorangehen, bei denen wir die Gewebsmenge, die Aminosäurekonzentration, die Zusammensetzung des Substrates und das pH desselben änderten.

Bei allen drei Untersuchungsarten haben wir keinen gesicherten Sauerstoffverbrauch der Hauptversuche gegenüber den Leerversuchen ohne l(—)-Leucin feststellen können. Dementsprechend lagen auch die gefundenen Werte für Ammoniak bezw. für Aceton innerhalb der Fehlergrenze. Aus diesem Ergebnis folgerten wir, daß die Niere und die Leber kein Fermentsystem enthält, das das l(—)-Leucin oxydativ abbaut. Wie sich das natürliche Leucin im Eiweißstoffwechsel verhält, ob es in anderen Organen einer Oxydation unterworfen wird, oder umaminiert wird, entzieht sich vorläufig unserer Kenntnis.

Experimenteller Teil.

1. Versuche mit Organbreien von Schweineleber und Schweineniere.

Das von uns verwendete l(—)-Leucin bezogen wir von Hofmann-La Roche. F. = 293°, $[\alpha] = -10^0$ (nach Fischer $[\alpha] = -10{,}42^0$), N = 10,69%.

Der Sauerstoffverbrauch wurde nach der Methode von Bacroft und Warburg manometrisch gemessen. Als Reaktionsgefäße dienten die hier im Institut verwendeten Gefäße mit Einsatz für Kalilauge und seitlich angebrachter Retorte zur Aufnahme der Aminosäurelösung. Die Gefäße waren durch einen Helmschliff mit den Manometern verbunden.

Die Organbreie wurden aus Schweinelebern und Schweinenieren bereitet, die wir frisch aus dem Schlachthof bezogen. Die Organe wurden zuerst mit einem Messer zerkleinert und dann in der Latapiemühle zermahlen. Zu einem Teil Brei wurden zwei Teile Natrium-Kaliumphosphatpufferlösung von $^1/_5$ molarer Konzentration

mit verschiedenen pH zugefügt und nach Durchmischung 4 g in die Reaktionsgefäße eingewogen. Die Retorten enthielten 2 ccm Pufferlösung, der im Hauptversuch je 10 mg l(—)-Leucin zugesetzt war. Bei jedem Versuch wurden die gleiche Anzahl Haupt- und Leerversuche (je 2 bzw. 3) angesetzt.

Nach Durchgasung mit Sauerstoff wurden die Retorten an den Reaktionsgefäßen befestigt, diese in den Thermostaten gebracht und der Temperaturausgleich abgewartet. Darauf wurden die Retorten gekippt, die Manometerschenkel auf die Marke Null eingestellt und in Abständen von 30 min der Sauerstoffverbrauch abgelesen. Die Temperatur des Thermostaten betrug 37,5°. Während der Dauer des Versuches wurden die Reaktionsgefäße gleichmäßig geschüttelt. Die Versuchsdauer betrug 3,5—4,5 Stunden. Die Differenz der Mittel der Haupt- und Leerversuche gibt den Mehrverbrauch an Sauerstoff durch die Aminosäure an. Nachstehend einige Versuche mit l(—)-Leucin bei verschiedenem pH und ein Kontrollversuch mit dem racemischen dl-Leucin.

Organbrei von Schweineleber und Schweineniere mit 10 mg l(—)-Leucin.

Brei	Leucin	Nr.	min	pH	Haupt	Leer	Diff.
Schweineleber	l(—)	6	210	7,0	704	672	+ 32
„ „	l(—)	9	210	6,8	605	558	+ 47
Schweineniere	l(—)	13	180	7,2	476	443	+ 33
„ „	l(—)	15	270	7,2	539	537	+ 2
„ „	dl	16	210	7,2	514	205	+ 309

Der theoretische Sauerstoffverbrauch für ein Atom pro Mol Leucin würde bei 10 mg im Falle eines 100%igen Abbaues 857,5 cmm betragen. Für den Versuch Nr. 9 ist die Differenz 5,5% d. Th. Unter gleichen Versuchsbedingungen verbraucht das racemische Leucin Nr. 16 309 cmm, das sind 84% d. Th. berechnet für die nichtnatürliche Komponente. Da ein Sauerstoffverbrauch von 5,5% innerhalb der Fehlerbreite liegt, so kann ein Abbau von l(—)-Leucin durch Leber- und Nierenbrei nicht angenommen werden.

2. Versuche mit Gewebsschnitten.

Nach Tötung der Versuchstiere (Ratten) wurden die Leber und die Niere herausgenommen und in einer 0,9%igen NaCl-Lösung von 40° gebracht. Von der Leber wurden die einzelnen Lappen abgetrennt und die Niere durch einen Längsschnitt in zwei gleiche Teile geteilt. Mit Hilfe einer sehr dünnen Rasierklinge, die in

einem Reagenzglashalter gefaßt wurde, fertigten wir von den Organen dünne ebene Schnitte an. Bei der Niere wurde nur die Rinde verwendet, sie ließ sich besser schneiden und atmete gleichmäßiger. Die Schnitte von der durchschnittlichen Dicke 0,2 mm wurden in einer Petryschale mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgenommen. Aus dieser wurden möglichst gleich große Schnitte herausgenommen und ihre Größe mit Hilfe von Millimeterpapier festgestellt. In jedes der vier Reaktionsgefäße wurden die gleiche Anzahl von Schnitten mit gleicher Gesamtoberfläche eingebracht. Zur Kontrolle diente am Schluß jeder Atmung eine Trockengewichtsbestimmung. Als Suspensionsflüssigkeit verwendeten wir die von Krebs angegebene Nährlösung mit 1,5 ccm 0,11 m $CaCl_2$, da bei der angegebenen Menge von 3 ccm $CaCl_2$ bei einem pH von größer als 7,0 das Calcium ausfiel. Nach einer größeren Reihe von Blindversuchen, die eine möglichst genaue Angabe von der Schwankungsbreite der Eigenatmung der Schnitte machen sollte, wurden Versuche angesetzt, denen im Hauptversuch 2,5 mg d-Leucin zugesetzt wurde. Das pH betrug 7,0—7,2, die Versuchsdauer währte 4—5,5 Stunden.

Rattenleberschnitte mit 2,5 mg d(+)-Leucin.

			Sauerstoffaufnahme cmm						Sauerstoffquotient					
			Leer			Haupt			Leer			Haupt		
Leucin	h	pH												
d(+)	5,5	7,2	197	71,5	59,5	128	226	129	4,4	2,1	2,2	2,9	9,2	3,5
d(+)	4	7,1	41	51	85	0	133	55	1,1	1,2	1,8	0	3,8	1,2
d(+)	5,5	7,1	510	480	391	405	452	421						
d(+)	5	7,1	81	74	—	74	66	—	1,2	0,9	—	1,5	0,96	—
l(—)	5	7,1	„	„	—	85	70	—	„	„	—	1,4	1,0	—

Aus der Tabelle geht die große Schwankungsbreite der Einzelatmungen hervor, es ist daher nicht angängig Mittelwerte anzugeben, die ein falsches Bild der wahren Verhältnisse geben würde. Die Versuche wurden mit dem nichtnatürlichen d(+)-Leucin ausgeführt, der mit l(—)-Leucin angesetzte Versuch zeigte kein unterschiedliches Verhalten. Die Rattenleber baut weder das d(+)-Leucin noch das l(—)-Leucin ab.

Unseren Atmungsversuchen mit Rattennierenschnitten setzten wir in einer Vergleichsreihe d(+)-Leucin zu und gingen, nachdem sich die nichtnatürliche Form abbauen ließ, dazu über den Schnitten die gleiche Menge (2,5 mg) l(—)-Leucin zu zusetzen.

Rattennierenschnitte mit 2,5 mg d(+)-Leucin und 2,5 mg l(—)-Leucin.

				Sauerstoff cmm				Sauerstoffquotient			
				Leer		Haupt		Leer		Haupt	
Nr	Leucin	h	pH								
34	d(+)	9,5	7,2	374	275	466	461	7,8	4,9	12,3	8,6
36	d(+)	7	7,2	294	297	384	268	11,4	9,4	9,9	8,5
37	d(+)	7,5	7,2	191	251	394	535	5,1	3,8	7,8	8,1
38	l(—)	6	7,4	305	345	—	254	6,5	7,0	—	4,8
39	l(—)	5	7,4	562	650	567	525	19,5	23,0	20,0	16,9
41	l(—)	5	7,2	134	135	—	178	5,9	5,9	—	6,9
45	l(—)	8	7,3	358	256	368	304	7,3	5,7	7,2	6,8

Dem eindeutigen Abbau des nichtnatürlichen d(+)-Leucin steht das Fehlen des Sauerstoffverbrauches bei der natürlichen Form gegenüber. Der einmalige Unterschied in Versuch Nr. 41 ließ sich nicht reproduzieren. Aus diesen Befunden folgerten wir, daß sich in der Rattenniere kein Fermentsystem befindet, das das l(—)-Leucin unter Sauerstoffverbrauch abbaut.

3. Versuche mit Makroschnitten.

Die hier verwendete Methode wurde in Anlehnung an die von Heinsen (7) angegebene Anordnung ausgeführt.

Von Meerschweinchenleber werden mit einem Rasiermesser Schnitte bis zu einer Stärke von 1 mm angefertigt, wobei es auf rasches Arbeiten ankommt. In einem mit 40° warmer 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllten Schälchen werden 5 g Schnitte eingewogen und dann in das Reaktionsgefäß gebracht. Bei diesen Versuchen wurden größere Gefäße verwandt und der Sauerstoff volumetrisch gemessen Felix und Zorn (8). Als Suspensionsflüssigkeit diente die Krebs'sche Lösung mit 1,5 ccm $CaCl_2$ und einem pH von 7,2—7,6.

Im Hauptversuch wurden 120 bzw. 50 ccm Flüssigkeit mit l(—)-Leucin versetzt und die Schnitte hinzugegeben. Die Aminosäurenkonzentration wurde variiert. Nachdem die Reaktionsgefäße mit den Manometern verbunden waren, wurden sie in den Thermostaten von 37,5° gebracht und mit Sauerstoff durchgast. Nach Temperaturausgleich wurde die Flüssigkeitssäule auf die Nullmarke eingestellt und in gleichen Zeiträumen der Sauerstoffverbrauch festgestellt. Während der Versuchsdauer wurden die Gefäße mit gleichmäßiger Geschwindigkeit im Thermostaten bewegt. Nach 3—7 Stunden wurden die Versuche beendet, die Schnitte aus den Gefäßen entfernt und nach Zusatz von primären Kaliumphosphat Ureaselösung zugesetzt. Nach weiteren zwei Stunden spülten wir den Inhalt der Gefäße in Kolben von 200 bzw. 100 ccm über, enteiweißten mit 25 bzw.

15 ccm Trichloressigsäure-Salzsäure-Lösung und ließen bis zum nächsten Tage stehen. Es wurde durch ein Faltenfilter filtriert und Ammoniak und Aceton bestimmt.

Ammoniakbestimmung.

25 ccm des Filtrates wurden mit 40 ccm Magnesia usta Aufschwemmung im Vakuum bei 30° überdestilliert. Als Vorlage dienten 10 ccm n/200 H_2SO_4. Nach einer Destillationsdauer von 30 Minuten wurde mit n/200 NaOH zurücktitriert.

Acetonbestimmung.

40 ccm des Filtrates und 5 ccm 5%iger HCl wurden in der Milchsäureapperatur 35 min lang destilliert. Während der Destillation tropfte Wasser zu, sodaß das Volumen der Flüssigkeit gleichblieb. Der Vorlage, die aus 10 ccm Wasser bestand und die mit Eis gekühlt war, wurden 10 ccm n/100 Jodlösung zugesetzt. Darauf wurden 5 ccm 25%iger KOH zugebracht, mit 5 cmm 25%iger HCl neutralisiert und den Überschuß an Jod mit n/100 $Na_2S_2O_3$ zurücktitriert.

Makroschnitte von Meerschweinchenleber.

							O_2 ccm		NH_3 mg		Aceton mg	
Nr.	h	g	pH	Fl	mg	m	Hpt	L	Hpt	L	Hpt	L
1	6	5	7,4	120	163,2	1/100	2,8	6,3	1,39	1,1	0,56	0,79
2	4	5	7,2	120	163,2	1/100	11,5	18,5	4,08	9,89	0,77	0,59
3	7	4	7,2	120	163,2	1/100	15,5	15,6	1,04	1,00	—	—
4	4	4	7,2	120	163,2	1/100	10,2	13,9	—	—	0,53	1,13
5	4	4	7,5	50	280	1/20	18,1	32,2	—	—	2,46	1,12
6	5	3	7,56	50	50	1/131	5,6	4,3	—	—	0,57	0,45
7	4	5	7,37	50	65,5	1/100	8,8	8,1	—	—	0,76	0,46
8	4	5	7,37	50	65,5	1/100	8,1	8,7	—	—	0,52	0,83

Hierbei sind h die Zeit in Stunden, g das Schnittgewicht in Gramm, Fl die Flüssigkeitsmenge in ccm, mg die l(—)-Leucinmenge in Milligramm, m die Molarekonzentration und Hpt der Haupt- und L der Leerversuch.

Die Tabelle zeigt, daß der Sauerstoffverbrauch uneinheitlich ist und die Hauptversuche keinen gesicherten Mehrverbrauch den Leerversuchen gegenüber aufweist. Ob es sich bei Versuch Nr. 5 um eine Hemmung der Atmung bei Aminosäurenzusatz handelt ließ sich nicht feststellen.

Das gebildete Ammoniak schwankt in gleichem Maße, auch hier war eine durch Leucinzusatz hervorgerufene Differenz nicht zu beobachten. Daher wurde nach einigen Orientierungsversuchen von einer weiteren Bestimmung abgesehen.

Eine Mehrentstehung von Aceton im Hauptversuch haben wir nicht gefunden. Die erhaltenen Werte sind unabhängig von dem Sauerstoffverbrauch. Wir zogen aus diesen Ergebnissen den Schluß, daß auch mit der Makroschnittmethode kein Abbau des l(—)-Leucin nachzuweisen ist.

Zusammenfassung.

1.) l(—)-Leucin läßt sich von Organbreien von Leber und Niere und von Gewebsschnitten dieser Organe unter Sauerstoffverbrauch nicht abbauen.

2.) l(—)-Leucin bildet kein Ammoniak und kein Aceton.

3.) d(+)-Leucin wird von Rattennierenschnitten oxydativ desaminiert.

Erwähnte Literatur.

1) Braunstein, A. E. und Kritzmann, M. G., Enzymologia 2, H. 3 (1938).
2) Edson, N., Biochem. J. 29, 2498 (1935).
3) Embden, G., Beitr. Chem. 11, 348 (1908).
4) Bernheim, F. and Bernheim, M., J. Biol. Chem. 109, 131 (1935).
5) Felix, K., Zorn, K. und Dirr-Kaltenbach, H., H. S. 247, 141 (1937).
6) Felix, K. und Zorn, K., H.S. 258, 16 (1939).
7) Heinsen, H., Ergeb. inn. Med. 54, 672 (1938).
8) Ikebe, K., J. of Biochem. 17, 275 (1933).
9) Kögl, F. und Erxleben, H. Kon. Ned. Akad. Wet., Verh. D. 38, N. 1, 1 (1939).
10) Krebs, H. A., H.S. 217, 191 (1933).
11) Krebs, H. A., Biochem. J. 29, 1620 (1935).
12) Löffler, W., Biochem. Z. 76, 69 (1916).

Lebenslauf.

Am 4. März 1914 wurde ich als Sohn des Apothekers Wilhelm Matthäus und seiner Ehefrau Wilhelmine, geb. Heimann, in Butzbach (Hessen) geboren. Nach dreijährigem Volksschulbesuch gehörte ich neun Jahre der dortigen Weidig-Oberrealschule an und bestand am 5. Februar 1932 die Reifeprüfung. Im Sommersemester 1932 begann ich in München das Studium der Medizin. Seit dem Wintersemester 1933/34 hörte ich außerdem Vorlesungen über Anthropologie und Zoologie. Die medizinische Vorprüfung bestand ich am 30. Oktober 1934 in München. Am 18. November 1937 promovierte ich in der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München zum Dr. phil. nat. Nachdem ich am 24. Juni 1938 das medizinische Staatsexamen in München bestanden hatte, fertigte ich als Medizinalpraktikant im Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main vorliegende Doktorarbeit an. Seit dem 1. April 1939 bin ich an der Medizinischen Klinik Frankfurt am Main tätig. Die Bestallung als Arzt erhielt ich am 1. Februar 1939.

41/36